

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom

REC D 14 AUG 1995

WIPO PCT



PRIORITY DOCUMENT

Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 4 augustus 1994 onder nummer 9401273,
ten name van:

HEINEKEN TECHNICAL SERVICES B.V.

te Amsterdam

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Pectines als schuimstabilisatoren voor dranken met een schuimkraag",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 1 augustus 1995.

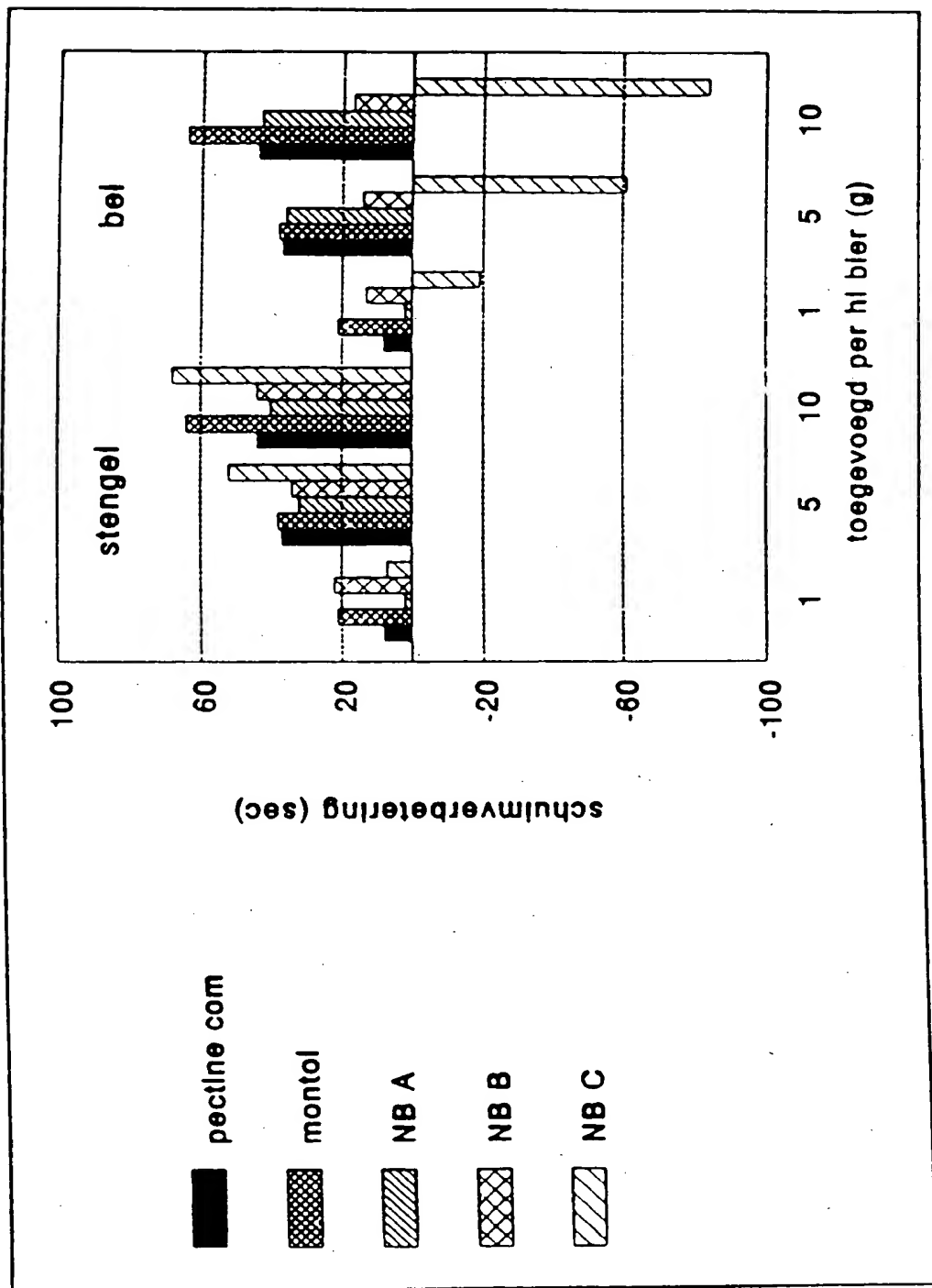
De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

P.R.T.F. Tupan

UITTREKSEL

De uitvinding voorziet in pectines als nieuwe schuimstabilisatoren voor (tijdelijke) schuimkragen bij dranken, met name bij bieren, in het bijzonder bieren van het pilsner type. Deze schuimstabilisatoren worden bij voorkeur verkregen uit hop, hetgeen een bier-eigen bestanddeel is en daarmee onder andere het voordeel biedt dat de schuimstabilisatoren geen negatieve invloed op de smaak van het bier behoeven te hebben. Bij voorkeur worden de pectines verkregen uit hopbellen of stengels. Het kan voordelig zijn om de pectines gedeeltelijk te verzepen, in verband met het aantal geladen groepen aan de pectines. Daarnaast voorziet de uitvinding in werkwijzen voor het verkrijgen van de pectines en dranken gestabiliseerd met de pectines volgens de uitvinding.

Verbetering van de schuimstabiliteit van pilsner referentiebiere, na toevoeging van hoppectine (uit stengels of bellen), commercieel pectine (100%) en montol (100%);



Titel: Pectines als schuimstabilisatoren voor dranken met een schuimkraag.

De uitvinding heeft betrekking op de toepassing van pectines in de stabilisering van schuimkragen van dranken zoals bier.

Daarnaast heeft de uitvinding betrekking op werkwijzen voor het verkrijgen van dergelijke pectines en dranken gestabiliseerd met dergelijke pectines.

Pectines zijn polysacchariden die met name voorkomen in de celwanden van dicotyle planten. De hoofdketen van pectines bevat α -D-galacturonzuur, terwijl de residuen L-rhamnose, D-galactose, L-arabinose, D-xylose en L-fucose kunnen bevatten. Elke plantesoort, in principe zelfs elke variëteit bezit soort-eigen pectines die in samenstelling afwijken van de pectines van andere soorten/variëteiten.

Pectines vonden tot nog toe hun toepassing met name in gelei-achtige produkten zoals confiture en andere vruchtengelei-produkten. De hierin toegepaste pectines worden over het algemeen uit appel- en citruspulp geïsoleerd (zie bijvoorbeeld het Amerikaanse octrooischrift no. 4.943.443).

Het Amerikaanse octrooi no. 5.008.254 beschrijft pectines geïsoleerd uit suikerbietenpulp die te gebruiken zijn voor het verbeteren van allerlei eigenschappen zoals voedingswaarde en in velerlei toepassingen zoals als verbetering van consistentie, non-hygroscopisch kleefmiddel, stabilisator van emulsies, etc.

In kolom 15 van het betreffende octrooischrift wordt de toepassing van deze pectines als schuimverbeteraar gemeld, met dien verstande dat het hier om marshmallows en imitatieslagroom gaat.

Deze permanente schuimen zijn natuurlijk niet te vergelijken met de schuimkraag van een drank zoals bier.

94 0 1 2 7 3

Bier onderscheidt zich van andere dranken onder meer door een aanhoudende schuimkraag.

Dankzij de natuurlijke bestanddelen van bier en de specifieke kennis van de brouwer kan een schuim van goede
5 kwaliteit verkregen worden.

De belangrijkste eigenschappen van een dergelijk schuim zijn:

- compactheid
- langzame, regelmatige inzakking
- 10 - goede adhesie aan de glaswand
- vorming van fijnmazige "clingen" bij opdrogen van het schuim

Deze parameters die van bijzonder belang zijn voor de appreciatie van het bier door de consument zijn redelijk
15 objectief te bepalen met behulp van op de markt verkrijgbare apparatuur.

Aan diverse bieren wordt voor het verkrijgen van een kwalitatief hoogwaardig schuim een schuimstabilisator toegevoegd.

20 Over het algemeen wordt de stof montol toegepast, hoewel ook kobaltzouten en ijzerzouten gebruikt zijn.

In een aantal landen is de toevoeging van dergelijke stoffen niet toegestaan, aangezien ze niet noodzakelijk zijn voor de bereiding van bier en/of niet eigen zijn aan bier.

25 Montol is een polypropyleenglycol-alginaat (een samenstelling van β -D-mannuronzuur en α -L-guluronzuur met een molecuulgewicht tussen 30.000 en 200.000). Deze stof wordt geïsoleerd uit algen. Het wordt met name geïsoleerd uit de bruine algen *Laminaria digitata* en *Macrocystis pyrifera*.

30 Een bekend nadeel van het gebruik van montol, afgezien van dat het niet bier-eigen is, is de kans op vorming van precipitaten in het eindprodukt.

De uitvinding voorziet nu in een werkwijze voor het verbeteren van de stabiliteit van de schuimkraag van dranken
35 waarbij aan de drank voor, tijdens of na het bereidingsproces daarvan, één of meer pectines worden toegevoegd.

Bij voorkeur worden pectines toegevoegd die uit de hopplant of andere noodzakelijke biergrondstoffen zijn geïsoleerd of geëxtraheerd, vanwege het feit dat deze pectines uit een bier-eigen ingrediënt afkomstig zijn en daarom geen invloed zullen hebben op de smaakeigenschappen, wat bij commercieel verkrijgbare pectines uit bijvoorbeeld citrusvruchten wel het geval zal kunnen zijn.

Hoewel hop in de vorm van hopbellen, pellets, hopconcentraten of geïsomriseerd hopextract wordt toegevoegd tijdens het proces van het bierbrouwen, leidt de aanwezigheid daarvan niet tot de aanwezigheid van pectines uit de hop met een schuimstabiliserende werking in het uiteindelijke bier, aangezien de procescondities van het brouwproces (bijvoorbeeld de hoge temperatuur bij neutrale pH bij het wortkoken) leiden tot afbraak van de pectines, onder andere door bijvoorbeeld de β -eliminatie reactie volgens Albersheim (Albersheim et al., 1960) (het verbreken van glycoside bindingen naast carboxymethylgroepen). Ten gevolge van deze afbraak gaat ook hun schuimverbeterend vermogen verloren.

Het Amerikaanse octrooischrift no. 3.099.563 dat betrekking heeft op schuimstabilisatoren voor bier, waarbij uitgegaan wordt van restprodukten van het brouwproces kan daarom geen betrekking hebben op pectines uit hop of andere biergrondstoffen. Welke stoffen met de werkwijze volgens dit octrooischrift wel bereid worden, is niet duidelijk.

Volgens de onderhavige uitvinding wordt bij voorkeur uitgegaan van pectines geïsoleerd uit verse hopdelen of uit bijprodukten van de hop-extractie.

Bij voorkeur worden de pectines volgens de onderhavige uitvinding verkregen uit de hopbellen, danwel de stengels van de hopplant. De pectines hoeven niet tot hoge zuiverheid te worden geïsoleerd, hoewel dat wel de voorkeur verdient, met name vanwege de mogelijke aanwezigheid van ongewenste stoffen die de smaak, de kleur of de schuimstabiliteit van het uiteindelijke eindprodukt negatief kunnen beïnvloeden, zoals bijvoorbeeld polyfenolen.

De werking van de pectines volgens de uitvinding berust waarschijnlijk op hetzelfde principe als de werking van montol. Pectines zowel als alginaten bezitten een lading in bier (zoals beschreven door Benard et al. Ann. Fals. Exp. Chim., 1981), waardoor zij een interactie kunnen aangaan met biereiwitten. Dit kan leiden tot een stabielere schuim.

Wanneer deze lading van de pectines inderdaad van belang is voor de schuimsatabiliserende werking daarvan, kan het voordelig zijn om de geïsoleerde pectines te onderwerpen aan een gedeeltelijke verzepingsreactie. De gemiddelde normale veresteringsgraad van 70% kan dan terug worden gebracht tot 40-50%.

In de gerefereerde publikatie van Benard et al. worden mogelijk aanwezige pectines alleen genoemd als storend bij een montolbepaling en wordt op enige functie van die pectines niet ingegaan.

De pectines volgens de uitvinding kunnen op elk gewenst moment vanaf ongeveer 10 minuten voor het einde van het wortkoken (dit is niet kritisch) tot aan het einde van het bereidingsproces worden toegevoegd. In ieder geval moeten zij zodanig laat worden toegevoegd dat de eerder genoemde afbraak niet in grote mate kan optreden. Bij voorkeur worden de pectines toegevoegd voor de helderbier filtratie, aangezien eventueel aanwezige precipitaten middels de filtratie kunnen worden verwijderd. Wanneer tijdens het brouwproces een stap wordt toegepast bekend als het nahoppen (het toevoegen van een hoppereparaat aan het eind van het wortkoken, kan aan dit hoppereparaat geschikt het pectinepreparaat worden toegevoegd.

De hoeveelheden pectine die toegevoegd moeten worden om de verbeterde stabiliteit te bewerkstelligen zijn door de vakman eenvoudig te bepalen. Zij zullen onder meer afhangen van de zuiverheid van het pectine-preparaat en de soort bier waaraan het preparaat wordt toegevoegd. Over het algemeen zal de hoeveelheid toe te dienen preparaat liggen tussen 0,5 en 20 g/hl, bij voorkeur rond de 3 g/hl.

De uitvinding is toepasbaar voor in principe alle biersoorten waar een schuimkraag gewenst is. Met name is de

uitvinding geschikt voor toepassing in bijvoorbeeld bier van het pilsner type. (Een laaggegist goudkleurig bier met een kenmerkende gehopte smaak.)

Volgens de uitvinding wordt met de pectines geïsoleerd
5 uit hop een minstens even goede stabiliteit van het schuim verkregen als met montol, zonder de daaraan verbonden nadelen en wordt wanneer de zuiverheid van de pectines voldoende groot is zelfs een verrassend betere schuimstabiliteit verkregen.

De uitvinding zal worden toegelicht aan de hand van de
10 volgende voorbeelden.

VOORBEELD 1

INLEIDING

De stabilisatie van het schuim met pectine berust waarschijnlijk op het feit dat pectine een lading heeft in
15 bier. Hierdoor kan het wellicht verbindingen vormen in het oppervlak van de schuimfilmpjes. Hop bevat 1-3% (d.s.) aan pectine. Derhalve zijn de pectines uit hop geïsoleerd en vergeleken met commercieel verkrijgbare pectines van Quest International.

94 0 1273

RESULTATEN

Wanneer pectines aan bier worden toegevoegd kan na 2 dagen incuberen onder schudden van de fles inderdaad een verbetering van de schuimstabiliteit worden opgemerkt. De schuimcijfers zijn weergegeven in tabel 1 (Nibem-meter).

Tabel 1		schuim- stabiliteit (sec)		gemiddeld	proef min blanco
10	Hoppectine (1 g/hl)	276	273	274	39
	5 "	266	285	275	40
	10 "	282	269	275	40
15	Pectine 1 "	283	262	272	37
	(vis 200) 5 "	283	305	289	54
	10 "	300	301	300	65
20	Pectine 1 "	275	271	273	38
	(200816) 5 "	289	288	288	53
	10 "	286	304	300	65
	Blanco 0 "	225	245	235	--

- 1 Pectine vertoont goede schuimstabiliserende eigenschappen in doseringen 5 g/HL in bier.
2. De schuimstabiliserende eigenschappen van hopbestanddelen berusten behalve op die van de bitterstoffen ook op die van de pectines uit hop.

METHODE

Uit een water-extract van hopbellen kunnen pectines (1-3% d.s.) geëxtraheerd worden volgens de volgende methode:

94 0 1 2 7 3

1. Extract incuberen met 0.3 N HCl bij 70°C gedurende 4 uur. Daarna centrifugeren, nadat de pH met Na₂CO₃ op 3 is gebracht.
2. Voeg vervolgens Al₂ (SO₄)₃ toe en stel de pH bij op 4 met Na₂CO₃. Centrifugeer het neerslag af.
3. Voeg vervolgens Al₂ (SO₄)₃ toe en stel de pH bij op 4 met Na₂CO₃. Centrifugeer het neerslag af.

De pectines zijn toegevoegd aan flessen bier in doseringen als aangegeven in tabel I. Hierna zijn de flessen twee dagen bij kamertemperatuur langzaam geschud. Tenslotte zijn op het servicelab de schuimstabiliteiten in duplo bepaald.

VOORBEELD 2

2.1 MATERIAAL

Met Northern Brewer A, B en C (Nederlandse hop) zijn oriënterende experimenten uitgevoerd. Met vier andere variëteiten (Duitse hop) zijn de experimenten herhaald. Northern brewer A en B zijn afkomstig van dezelfde locatie, Northern brewer C is van een andere locatie afkomstig.

Tabel 2

Variëteit hop	Hopbellen	Stengels	Afval
Northern brewer A	X	X	-
Northern brewer B	X	X	-
Northern brewer C	X	x	-
<hr/>			
Hersbrücker	X	X	X
Aroma perle	X	X	X
Northern brewer	X	-	X
Brewers gold	X	X	X

De schuimstabilisatie experimenten zijn ter vergelijking ook uitgevoerd met commerciële citrusspectine (DE 67%) en montol. Voor de schuimexperimenten is gebruik gemaakt van referentie pilsner bier.

5

2.2 METHODEN

1) Extractie van pectine

De afzonderlijke onderdelen van de hopplant (stengels, 10 bellen, bladeren en het afval) zijn met water (aangezuurd tot pH 2) geëxtraheerd om pectine te isoleren. De gevolgde procedure is vermeld in bijlage 1.

2) Bepaling AUA-gehalte en veresteringsgraad

15 De zuiverheid van de geïsoleerde pectinefracties is bepaald met behulp van een titratie/verzeping/titratie. JECFA: Compendium of food additive specifications, volume 2, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome 1992, pp 1055.

20 Het gehalte AUA (anhydrogalacturonzuur) kan op deze manier bepaald worden. Hiermee is ook de veresteringsgraad (DE) van de fracties bepaald.

3) Bepaling schuiminvloed pectine

25 De gezuiverde pectinefracties zijn aan bier toegevoegd om de invloed ervan op de schuimstabiliteit te bepalen. De procedure staat beschreven in bijlage 2.

2.3 RESULTATEN

30

2.3.1 Nederlandse hop

De Nederlandse hopplanten zijn op twee tijdstippen geoogst om variatie te onderzoeken in de rijpheid van de plant (tijdstip 1 is het juiste moment van oogsten; de hopbellen 35 hebben de vereiste rijpheid (plant A); tijdstip 2 is \pm 3 weken na het juiste tijdstip van oogsten (de bladeren, bellen en stengels zijn hierbij verdord (plant B en C)). In tabel 3 zijn

de opbrengsten van de geëxtraheerde pectinefracties weergegeven. De bladeren van alle planten gaven een te lage opbrengst aan pectine, waardoor deze verder niet apart zijn meegenomen.

5

Tabel 3 Opbrengsten van extractie van de Nederlandse hopplanten

10	Pectine	ingewogen (g)	volume- extractie (ml)	pectine gewicht (mg)	% geëxtra- heerd
15	Stengel A	20	100	440	2,2
	Stengel B	90	500	310	0,34
	Stengel C	610	2600	3500	0,57
	Bellen A	30	250	440	1,2
	Bellen B	75	600	520	0,69
20	Bellen C	160	1300	1400	0,88

Uit de stengels en bellen is op het juiste moment van oogsten meer pectine te isoleren dan ± 3 weken na dit tijdstip. Vooral de stengels zijn gevoelig voor het tijdstip van oogsten (het geëxtraheerde pectinegehalte neemt 75-85 % af).
 25 Ook de zuiverheid van de fracties neemt af (% AUA van 80 naar 70). De veresteringsgraad van de bellen en stengels blijft in de tijd gelijk en bedraagt voor beide 75%.

In figuur 1 is de invloed van de hoppectines weergegeven op de schuimstabiliteit van bier in vergelijking met
 30 commercieel citrusspectine (DE 67%) en montol (in bijlage 3 zijn de resultaten in tabellen weergegeven). Bij de dosering van de pectinefracties is uitgegaan van 100% zuiverheid. De AUA-gehalten van stengel A en bel A bedraagt echter 80%, van stengels B en C en bellen B en C bedraagt het AUA gehalte 70%.
 35 Bij de vergelijking met montol moet hier rekening mee gehouden

94 0 1 2 7 3

worden. Bij de experimenten met de Nederlandse hop is hiervoor niet en bij de experimenten met Duitse hop wel gecorrigeerd.

De schuimstabiliserende werking van stengel/bel pectine (A en B) is tot een gehalte van 5 g/hl gelijk aan de werking van montol. Bij hogere concentraties blijft de werking van hoppectine achter in vergelijking met montol (mede door 70-80% zuiverheid van de fracties). Stengel/bel pectine geëxtraheerd uit plant C laten een afwijkend patroon zien. Het bel pectine heeft hierbij een negatief effect op de schuimstabiliteit, terwijl het stengelpectine een groter positief effect heeft op de schuimstabiliteit in vergelijking met stengelpectine van plant A en B. Het is mogelijk dat in geval van het bel pectine (plant C) er meer schuimnegatieve componenten (zoals poly-fenolen) zijn mee geëxtraheerd.

3.2 Duitse hop

Uit de stengels, bellen en het afval van vier Duitse hopvariëteiten is eveneens pectine geëxtraheerd. De opbrengsten zijn weergegeven in tabel 4. De bladeren zijn in de experimenten niet meegenomen door de lage pectine opbrengsten bij Nederlandse hopplanten. Afval is een mengsel van stengels, bladeren en bellen zoals dit na de oogst op het veld achterblijft.

Tabel 4 Opbrengsten van de pectine-extractie uit de Duitse hopplanten

	Pectine	ingewogen (g)	volume- extractie (ml)	pectine gewicht (mg)	% geëxtra- heerd
5					
	Stengel 1	250	1250	2,64	1,06
10	Stengel 2	250	1250	5,46	2,18
	Stengel 4	250	1250	4,99	2,00
	Bellen 1	165	1750	4,36	2,64
	Bellen 2	165	1750	3,26	1,98
	Bellen 3	165	1750	2,36	1,43
15	Bellen 4	150	1750	3,01	2,00
	Afval 1	250	1750	4,04	1,62
	Afval 2	250	1750	3,75	1,50
	Afval 3	250	1750	6,73	2,69
20	Afval 4	250	1750	4,78	1,91

Uit de Duitse hop wordt een grotere pectinefractie geëxtraheerd dan uit de Nederlandse hop. De zuiverheid van deze preparaten is echter lager dan bij de Nederlandse hop. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat bij de Duitse hop meer materiaal tegelijk is opgewerkt. De AUA-gehalten zijn weergegeven in figuur 2 (in bijlage 6 zijn de resultaten in tabellen weergegeven).

De gemiddelde zuiverheid van de fracties ligt rond de 60%. De veresteringsgraad van alle geïsoleerde pectinefracties ligt rond de 70% (in bijlage 6 zijn de resultaten in tabellen weergegeven).

In figuur 3 t/m 5 is de invloed van de verschillende hoppectinefracties weergegeven op de schuimstabiliteit van referentie bier in vergelijking met commercieel citrusspectine (DE 67%) en montol (in bijlage 4 zijn de resultaten in tabellen weergegeven). In deze figuren is ervan uitgegaan dat

de pectinefracties een zuiverheid van 60% hebben. De concentratie van het toegevoegde montol is daarom ook teruggebracht naar 60% om beide goed met elkaar te kunnen vergelijken.

5 Stengelpectine, hopbelpectine en montol geven een nagenoeg
gelijke schuimstabiliteit na toevoeging aan referentiebier. Bij
een toevoeging van 3 g/hl bedraagt de schuimverbetering \pm 40
sec. Afvalpectine geeft bij een dosering van 3 g/hl gemiddeld
een schuimverbetering van 35 sec. Voor alle pectine fracties
10 geldt dat de stabilisatie variëteit afhankelijk is. Als de
dosering van de pectinefracties wordt aangepast, zodat 1, 5 en
10 g AUA/hl wordt gedoseerd, wordt de schuimstabiliteit niet
evenredig verhoogd (zie figuur 6, in bijlage 5 zijn de
resultaten in tabellen weergegeven). De fracties zijn gemiddeld
15 maar 60% zuiver, de overige 40% kan ook bestaan uit
schuimnegatieve componenten. Als de dosering van de
pectinefracties wordt verhoogd, kunnen er ook meer
schuimnegatieve componenten in het bier terecht komen. Om dit
probleem kleiner te maken of uit te sluiten moeten de fracties
20 meer gezuiverd worden.

Na toevoeging aan water en bier is onderzocht of de
geïsoleerde pectinefracties detecteerbaar waren met behulp van
de montoltest. Als standaard is mannuronzuur meegenomen. In
figuur 7 zijn de chromatogrammen weergegeven. Hieruit blijkt
25 dat volgens deze methode pectine niet aantoonbaar is. Het
verloop van het standaard bier is identiek als het verloop van
standaardbier waaraan hoppectine is toegevoegd.

2.4 CONCLUSIES

30 Uit de verschillende onderdelen van de hopplant (stengels,
bellen) zijn pectines te extraheren. De pectineopbrengst uit
bladeren was te gering voor experimenten. Wel is er voldoende
pectine te extraheren uit het afval wat na de oogst op het veld
achterblijft. De zuiverheid (AUA-gehalte) van de
35 pectinefracties blijkt af te hangen van het oogsttijdstip,
hoeveelheid materiaal bij opwerken en de hopvarieteit. De
veresteringsgraad van de Nederlandse hopplanten is gemiddeld

75% en van de Duitse hopplanten 70%. Er is hierbij weinig onderscheid zichtbaar tussen stengels, bellen of het afval. Na toevoeging aan pilsner referentie bier leveren "stengel" en "hopbel" pectine de beste schuimverbeteringen op en deze
5 resultaten zijn vergelijkbaar met montoltoevoegingen. Een toevoeging van 3 g pectine of montol per hl levert een schuimverbetering van ± 40 sec op.

Bijlage bij voorbeeld 2

BIJLAGE 1 EXTRACTIEPECTINE UIT HOP

- 5 1 De afzonderlijke hoponderdelen (bellen, bladeren, stengels en het afval) malen (vooraf bevriezen met stikstof)
- 2 2 Warm water toevoegen (water:materiaal verhouding, zie tabel 4.1 en 4.2), aanzuren met HCl tot pH 2
- 3 3 Gedurende 2 uur bij 80°C onder constant roeren
- 10 4 Filtreren over kaasdoek
- 5 5 Supernatant mengen met alcohol 96% (1:2) zonder te neutraliseren
- 6 6 Filtreren over kaasdoek
- 7 7 Neerslag 2x uitwassen met 60% alcohol
- 15 8 Neerslag 1x uitwassen met 96% alcohol (tussendoor met de ultraturrax fijnmalen)
- 8 9 Over kaasdoek filtreren
- 9 9 Gedurende de nacht dogen in petrischaal

20 BIJLAGE 2 BEPALING SCHUIMINVLOED VAN PECTINEN

- 1 1 Gedroogde pectinen worden fijngemaakt en onder verwarming opgelost in 5 ml water alvorens ze worden toegevoegd aan bier in de volgende concentraties: 3 mg/flesje (\pm 1 g/hl),
- 25 15 mg/flesje (+ 5 g/hl), 30 mg/flesje (+ 10 g/hl). Hierbij is ervan uitgegaan dat de pectinefracties 100 % zuiver waren. Een experiment wordt uitgevoerd waarbij de toevoeging gebaseerd is op de werkelijke zuiverheid van de pectinefracties.
- 30 2 De flesjes worden geschud (50 rpm) gedurende 48 uur (Nederlandse hop) of 60 uur (Duitse hop)
- 3 3 Meting van de schuimstabiliteit met de Nibem-meter.

BIJLAGE 3 RESULTATEN SCHUUMSTABILITEIT NA TOEVOEGING VAN
PECTINEN AAN BIER (PECTINEN GEISOLEERD UIT NEDERLANDSE HOP) -
toevoeging gebasserd op 100% zuiverheid

	temalte toegevoegd g/hl	werkelijk temalte g/hl	SCHUUMSTABILITEIT sec	proef min blanco sec
Commercial pectine	1	1	273	16
19-9-93	5	5	276	19
blanco 167 sec	10	10	287	10
12-10-93	1	1	273	7
blanco 167 sec	5	5	285	18
	10	10	296	29
28-10-93	1	1	288	8
blanco 176 sec	5	5	313	17
	10	10	320	44
scenarij A	1	0.8	265	8
19-9-93	5	4	281	24
blanco 167 sec	10	8	285	28
28-10-93	1	0.8	273	-1
blanco 176 sec	5	4	308	32
	10	8	316	40
scenarij B	1	0.7	298	22
16-10-93	5	3.5	310	34
	10	7	320	44
scenarij C	1	0.7	276	9
12-10-93	5	3.5	305	38
blanco 167 sec	10	7	318	51
28-10-93	1	0.7	283	7
blanco 176 sec	5	3.5	328	52
	10	7	---	--
cellen A	1	0.8	265	8
19-9-93	5	4	284	27
blanco 167 sec	10	8	284	27
28-10-93	1	0.8	265	-9
blanco 176 sec	5	4	312	36
	10	8	319	43
cellen B	1	0.7	289	13
16-10-93	5	3.5	290	14
	10	7	293	17
cellen C	1	0.7	238	-19
12-10-93	5	3.5	292	-75
blanco 167 sec	10	7	280	-47
28-10-93	1	0.7	247	-19
blanco 176 sec	5	3.5	215	-41
	10	7	292	-64
control	1	1	297	21
18-10-93	5	5	314	38
blanco 176 sec	10	10	340	64

94 0 1273

BIJLAGE 4 RESULTATEN SCHUIMSTABILITEIT NA TOEVOEGING VAN
PECTINEN AAN BIER (PECTINEN GEISOLEERD UIT DUITSE HOP) - toevoeging
gebaseerd op 100% zuiverheid

experiment (5-11-199)	temalte toegevoegd g/l	verschillen temalte g/l	schuimstabiliteit sec	proef min blanco sec
blanco water	-	-	102	--
blanco water	-	-	106	--
commercieel pectine	1	1	123	19
	5	5	137	33
	10	10	156	52
moncol	0.6	0.6	114	10
	1	1	135	31
	3	3	146	42
	5	5	167	63
	6	6	168	64
	10	10	181	77
stengel 1	1	0.66	119	15
	5	1.3	146	42
	10	6.6	154	50
stengel 2	1	0.75	123	19
	5	1.75	143	19
	10	7.5	174	69
stengel 4	1	0.64	120	16
	5	1.2	136	32
	10	6.4	168	64
bellen 1	1	0.61	125	21
	5	1.05	151	47
	10	6.1	165	61
bellen 2	1	0.65	116	12
	5	1.25	142	38
	10	6.5	166	62
bellen 3	1	0.56	119	15
	5	2.8	146	42
	10	5.6	160	56
bellen 4	1	0.6	113	9
	5	3	141	37
	10	6	159	55
afval 1	1	2.55	120	16
	5	2.75	---	--
	10	5.5	145	41
afval 2	1	0.56	120	16
	5	2.3	139	35
	10	5.6	151	47
afval 3	1	2.72	109	5
	5	1.8	134	30
	10	7.2	160	56
afval 4	1	0.65	114	10
	5	1.25	141	39
	10	6.5	152	46

BIJLAGE 5 RESULTATEN SCHUIMSTABILITEIT NA TOEVOEGING VAN PECTINEN AAN BIER (PECTINEN GEISOLEERD UIT DUITSE HOP) - toevoeging gebaseerd op gemeten zuiverheid (bijlage 3)

Experiment 3-11-1991	pectine toegevoegd g/dl	verkelijk pectine AUA g/dl	Schuimstabiliteit sec	Proef na blanco sec
blanco water	..		101	..
scandol 1	5.1	1	122	21
	11	5	148	47
	41	10	159	58
scandol 4	4.7	1	123	22
	23	5	141	40
	47	10	173	72
noncol	1.8	1.8	111	10
	3	3	129	28
	9	9	143	42
	15	15	158	57
	18	18	169	68
	30	30	178	77

BIJLAGE 6 ZUIVERHEID VAN DE PECTINEFRACTIES (AUA-GEHALTE) EN DE VERESTERINGSGRAAD (DE) VAN DE DUITSE HOPVARIETEITEN

monster	AUA (mg)	AUA (%)	DE (%)
pectine commercieel	285	95	69
scandol 1	146	66	76
scandol 2	227	75	70
scandol 4	192	64	73
hopbel 1	183	61	69
hopbel 2	194	65	75
hopbel 3	164	56	72
hopbel 4	181	60	68
afval 1	164	55	75
afval 2	167	56	77
afval 3	215	72	70
afval 4	195	65	77

VOORBEELD 3**3.1 MATERIAAL**

Er is gebruik gemaakt van residuen van de volgende
5 hopextracten:

- A Ethanol extract residuen
- B CO₂ extract residuen
- C CO₂ extract residuen
- D Hexaan extract residuen

10 De schuimstabilisatie experimenten zijn ter vergelijking ook uitgevoerd met commerciële citrusectine (DE 67%), montol en eerder gezuiverde pectine fracties uit hop stengels en hop bellen (voorbeeld 2)

15 Voor de schuimexperimenten is referentie bier gebruikt.

3.2 METHODEN**3.2.1) Extractie van pectine**

De gemalen residuen worden met water (aangezuurd tot
20 pH 2) geëxtraheerd om pectine te isoleren. De gevolgde procedure is vermeld in bijlage 1.

3.2.2) Bepaling schuiminvloed pectine

25 De gezuiverde pectinefracties zijn aan bier toegevoegd om de invloed ervan op de schuimstabiliteit te bepalen. De procedure staat beschreven in bijlage 2.

3.3 RESULTATEN

30 Van verschillende hopleveranciers zijn residuen verkregen die overblijven na het vervaardigen van hopextracten. Uit deze residuen zijn pectines geïsoleerd. De opbrengsten zijn in tabel 5 weergegeven. De opbrengsten aan pectine uit deze residuen zijn vergelijkbaar met de opbrengsten uit vers materiaal (bellen en stengels). Residuen van CO₂ extracten
35 waren van twee leveranciers afkomstig en geven een verschillende opbrengst aan pectine te zien. De extractie-procedure is echter niet volledig bekend voor beide leveranciers en er is gebruik gemaakt van verschillende hop

variëteiten. Uit voorbeeld 2 is gebleken dat de variëteit van invloed is op de hoeveelheid pectine die geïsoleerd kan worden.

5 **Tabel 5** Opbrengst van pectinefracties gezuiverd uit
residuen welke zijn ontstaan bij de bereiding van
verschillende hopextracten

10	Monster	Opbrengst pectine (%)
	residuen ethanol extract A	2,3
	residuen CO ₂ extract B	1,8
	residuen CO ₂ extract C	2,5
15	residuen hexaanextract D	2,4

In figuur 8 is de invloed van de residu pectines weergegeven op de schuimstabiliteit van pilsner bier in vergelijking met commercieel citrusectine, montol en
 20 stengelpectine (zie voorbeeld 2). In bijlage 3 zijn de resultaten in tabellen weergegeven. Bij de dosering van de pectinefracties is uitgegaan van 100% zuiverheid. Het AUA-gehalte van de residufracties zal echter lager zijn (is niet bepaald). Bij de vergelijking met montol moet hiermee rekening
 25 gehouden worden.

De schuimstabiliserende werking van pectine uit ethanol- en hexaan extract residuen is niet noemenswaardig. Bier waaraan deze pectines zijn toegevoegd vertonen een vrijwel gelijke schuimstabilisatie als blanco bier. Een positief
 30 effect kan worden waargenomen na toevoeging van pectines uit residuen van CO₂ extracten. Bij een toevoeging van 10 g pectine/hl bedraagt de schuimverbetering 26 sec. De pectines uit stengel en bellen (vorig onderzoek) geven een verhoging van 40 sec, waarbij echter niet gecorrigeerd is voor de
 35 zuiverheid van de fracties.

BIJLAGE 1 (bij voorbeeld 3) EXTRACTIE VAN PECTINE UIT HOP

- 1 De residuen van de verschillende extracten malen (vooraf bevroren met stikstof)
- 5 2 Warm water toevoegen (water:materiaal verhouding, zie tabel 4.1), aanzuren met HCl tot pH 2
- 3 Gedurende 2 uur bij 80°C onder constant roeren Filtreren over kaasdoek Supernatant mengen met alcohol 96% (1:1,5) zonder te neutraliseren
- 10 4 Filtreren over kaasdoek
- 5 Neerslag 3x uitwassen met 96% alcohol
- 6 Over kaasdoek filtreren
- 7 Gedurende de nacht drogen in petrischaal

15 BIJLAGE 2 (bij voorbeeld 3) BEPALING SCHUIMINVLOED VAN PECTINES

- 1 Gedroogde pectines worden fijngemaakt en onder verwarming opgelost in 5 ml water alvorens ze worden toegevoegd aan
- 20 bier in de volgende concentraties: 15 mg/flesje (\pm 5 g/hl) en 30 mg/flesje (\pm 10 g/hl). Hierbij is ervan uitgegaan dat de pectinefracties 100% zuiver waren.
- 2 De flesjes worden geschud (50 rpm) gedurende 60 uur bij kamertemperatuur.
- 25 3 Meting van de schuimstabiliteit met de Nibem-meter.

**BIJLAGE 3 SCHUIMSTABILITEIT VAN BIEREN WAARAAN
VERSCHILLENDE PECTINEFRACTIES ZIJN TOEGEVOEGD
(bij voorbeeld 3)**

5	Monster	Toegevoegde hoeveelheid g/hl	Schuim- stabiliteit sec	Verhoogde stabiliteit sec
10	Blanco	--	280	--
	Blanco water	--	300	--
	Residuen hexaan	5	300	0
	extract A	10	294	0
15	Residuen CO ₂	5	302	2
	extract B	10	327	27
	Residuen CO ₂	5	300	0
20	extract C	10	326	26
	Residuen ethanol	5	296	0
	extract D	10	298	0
25	Montol	5	345	45
		10	361	61
	Commercieel	5	323	23
	pectine	10	355	55
30	Stengel 1	10	344	44
	Bellen 1	10	338	38

94 0 1273

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het verbeteren van de stabiliteit van de schuimkraag van dranken waarbij aan de drank voor, tijdens of na het bereidingsproces daarvan één of meer pectines worden toegevoegd.
- 5 2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij een uit hop verkregen extract van één of meer pectines wordt toegepast.
3. Werkwijze volgens conclusie 2, waarbij het extract wordt verkregen uit stengels en/of bellen van de hopplant.
4. Werkwijze volgens conclusie 1-3, waarbij de drank bier is.
- 10 5. Werkwijze volgens conclusie 4, waarbij pectines worden toegevoegd tijdens het bereidingsproces vanaf 30 minuten voor einde wortkoken, zodanig dat er geen significant deel van de schuim-stabiliserende activiteit verloren gaat door het koken.
- 15 6. Werkwijze volgens conclusie 5, waarbij pectines worden toegevoegd voor de helderbierfiltratie.
7. Werkwijze volgens één der conclusies 4-6, waarbij tussen 0,5 en 30 g pectine per hectoliter bier wordt toegevoegd.
8. Werkwijze volgens conclusie 7, waarbij ongeveer 3-10 g
- 20 pectine per hectoliter bier wordt toegevoegd.
9. Drank met een gestabiliseerde schuimkraag verkrijgbaar met een werkwijze volgens één der voorgaande conclusies.
10. Bier met een gestabiliseerde schuimkraag verkrijgbaar met een werkwijze volgens één der conclusies 1-8.
- 25 11. Bier verkregen volgens één der conclusies 1-8.
12. Het gebruik van hoppectines als schuimstabilisator voor schuimkragen van dranken.
13. Werkwijze voor het extraheren van pectines uit hop, waarbij hopplanten of delen daarvan worden onderworpen aan een
- 30 extractie in een waterige oplossing bij een temperatuur van 50-100°C en een pH van 1-3,5.

Verbetering van de schuimstabiliteit van pilsner referentiebiel, na toevoeging van hoppectine (uit stengels of bellen), commercieel pectine (100%) en montol (100%)

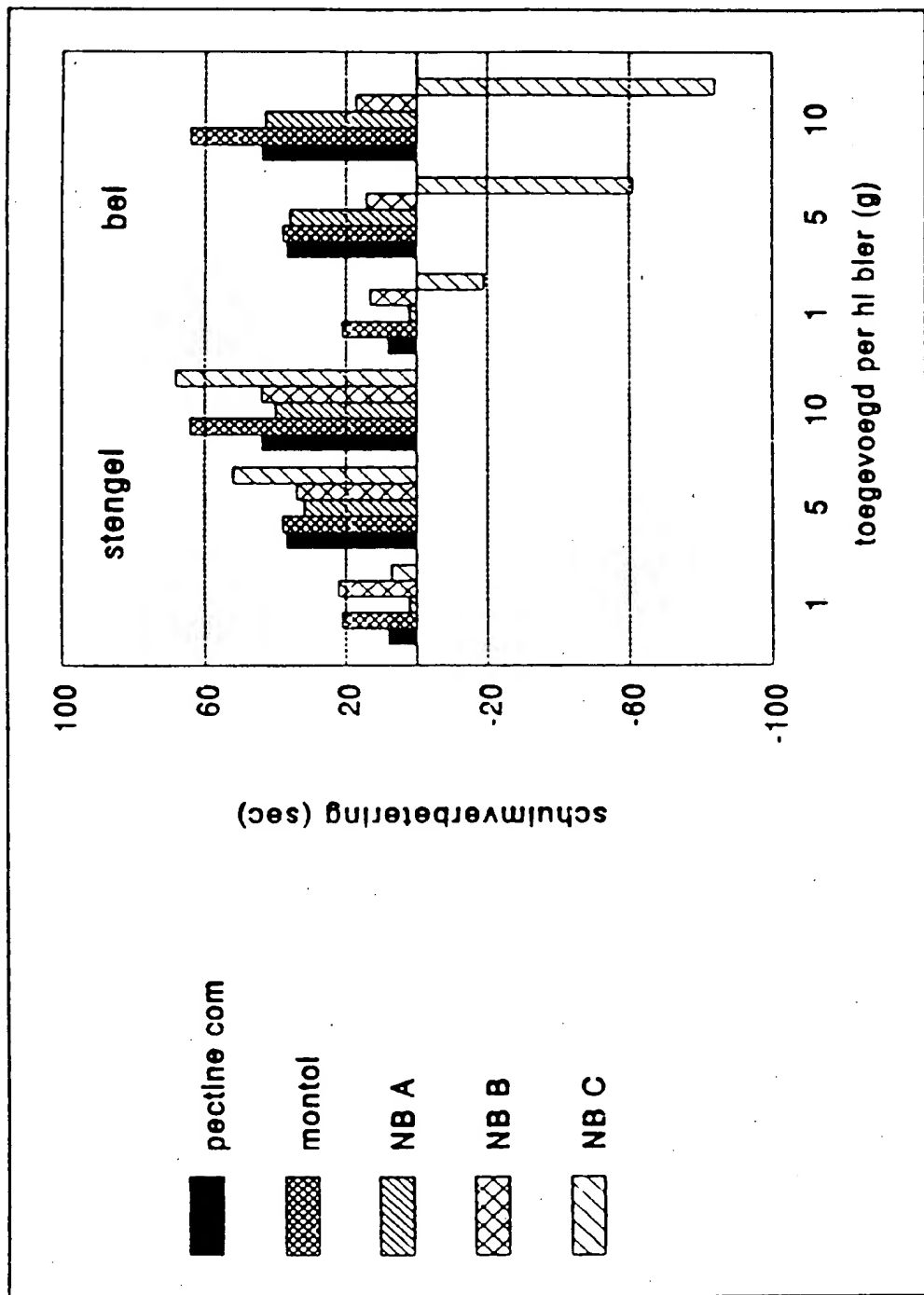


FIG.1

Zuiverheid (AUA-gehalten) van de geïsoleerde pectinefracties uit hop
(stengels, bellen en het a'val)

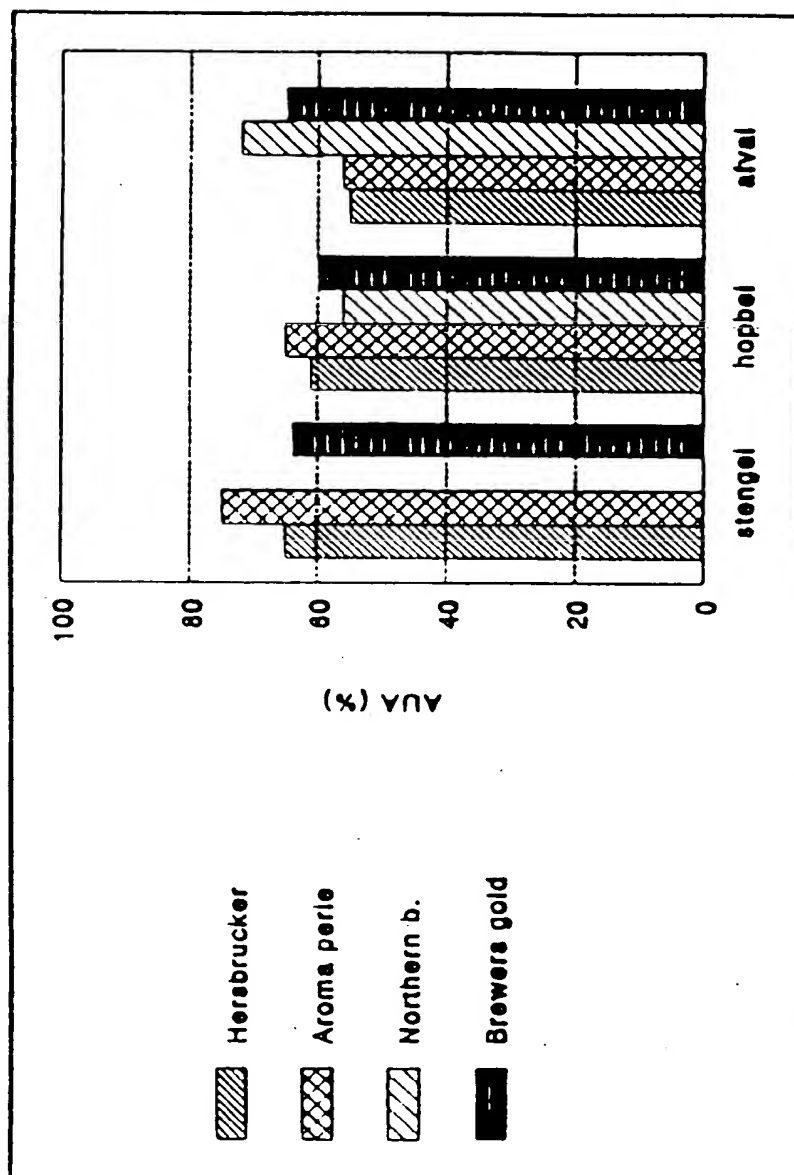


FIG. 2

Verbetering van de schuimstabiliteit van pilsner referentiebiert, na toevoeging van hoppectine uit afval en montol (60%)

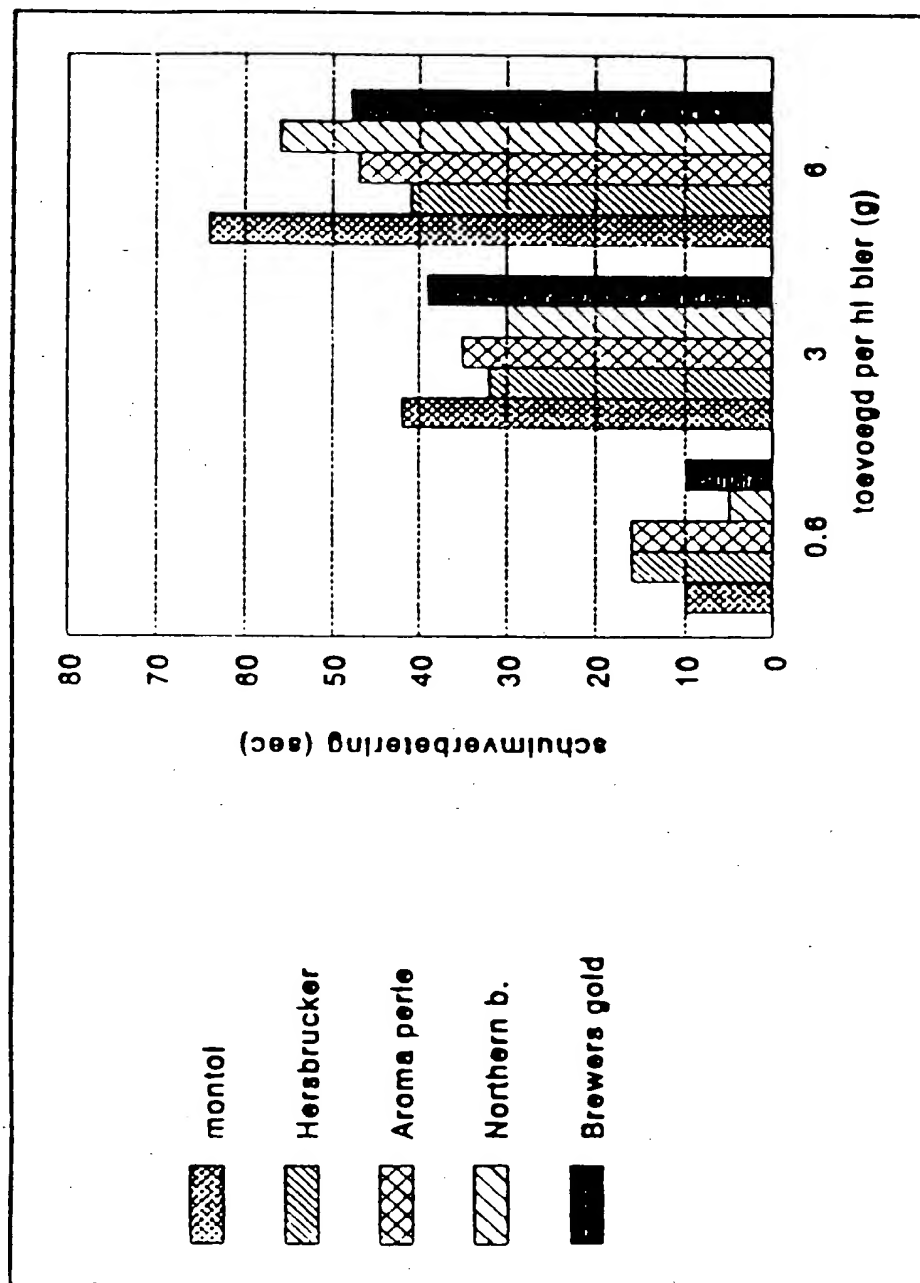


FIG. 3

Verbetering van de schuimstabiliteit van pilsner referentiebiert, na toevoeging van hoppectine uit stengels en montol (60%)

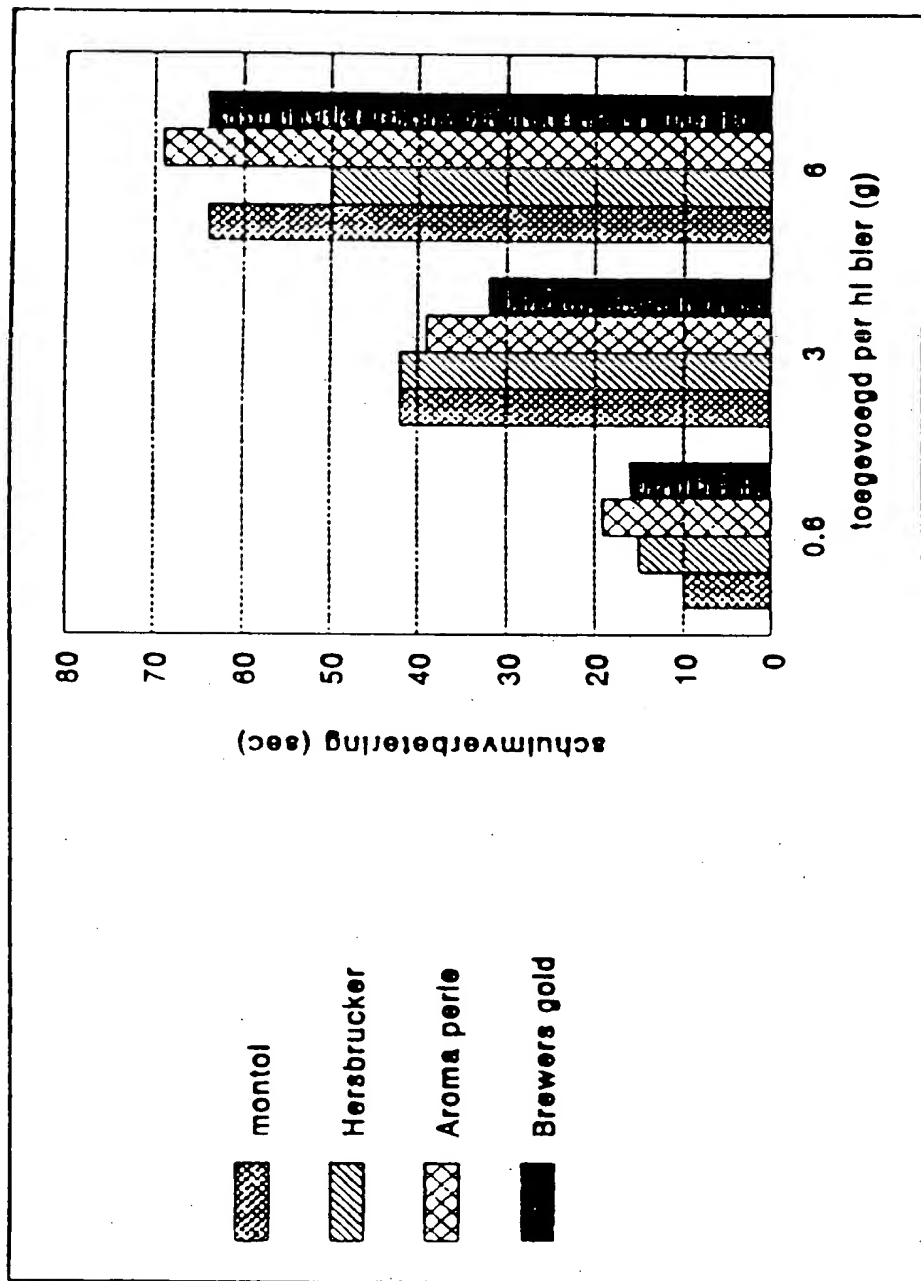


FIG.4

Verbetering van de schuimstabiliteit van (pilsner) referentiebier, na toevoeging van hoppectine uit bellen en montol (60%)

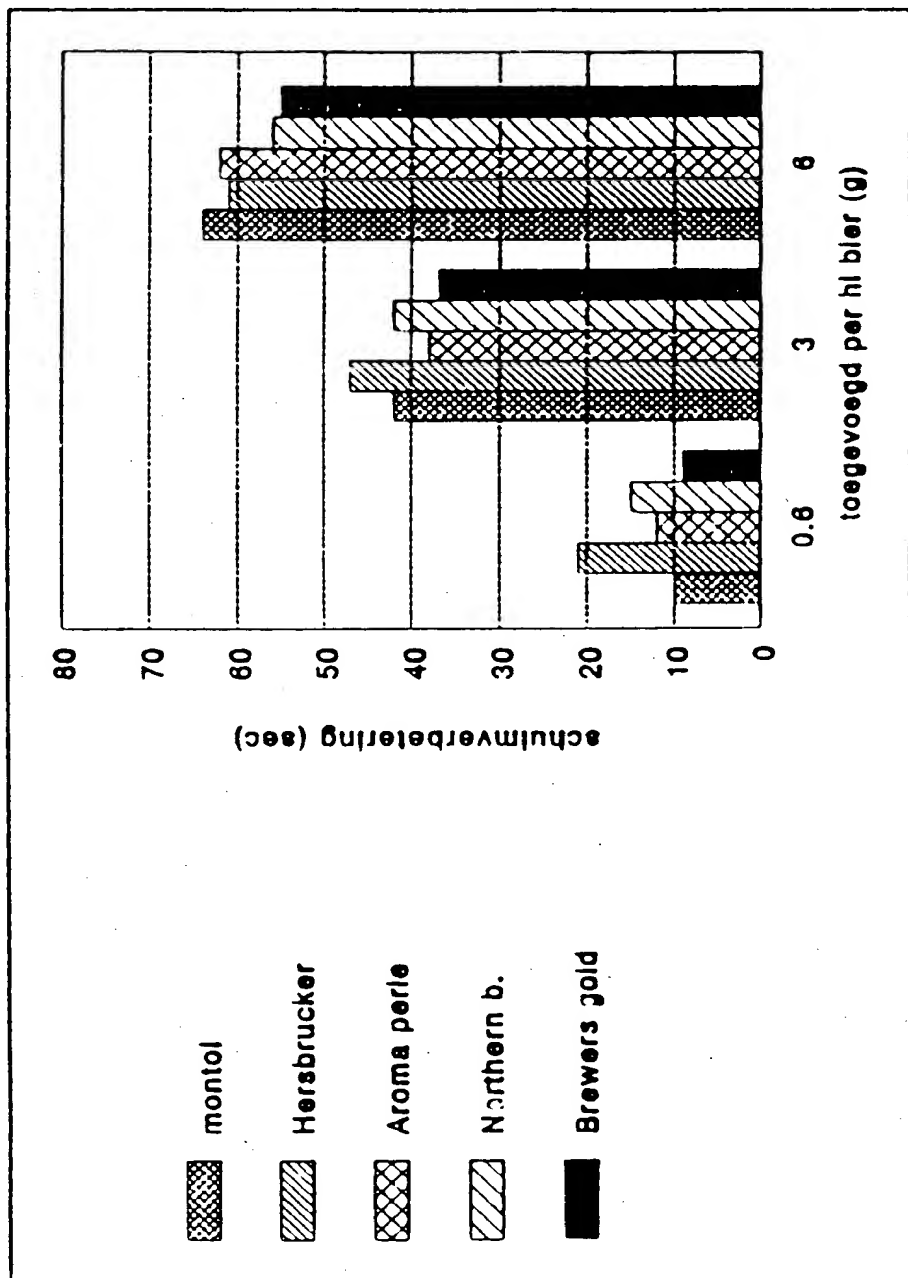


FIG.5

Verbetering van de schuimstabiliteit van pilsner referentiebiert, na toevoeging van hoppectine uit stengels, (gecorrigeerd) en montol (100%)

Verbetering van de schuimstabiliteit van referentiebiert, na toevoeging van hoppectine uit stengels, (gecorrigeerd) en montol (100%)

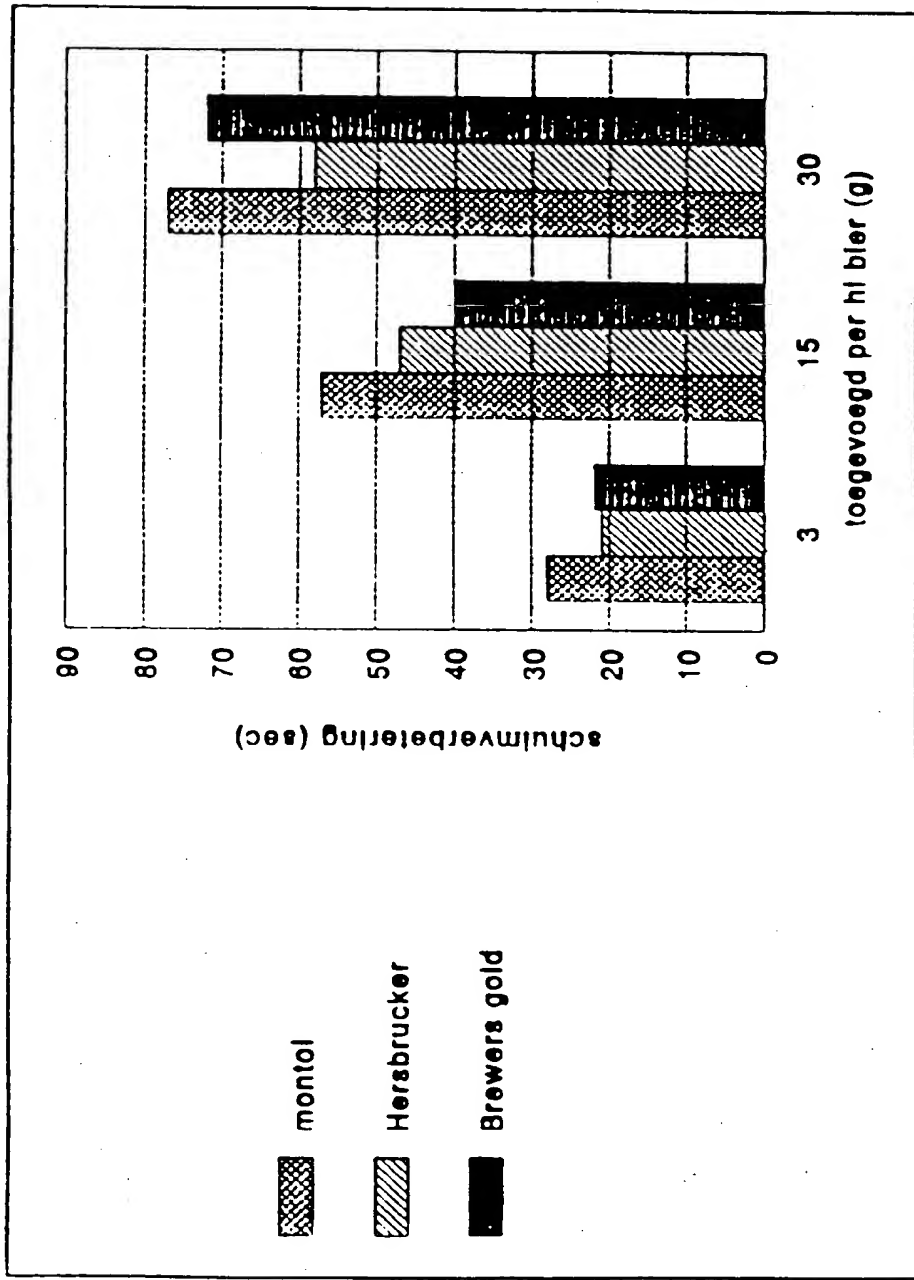


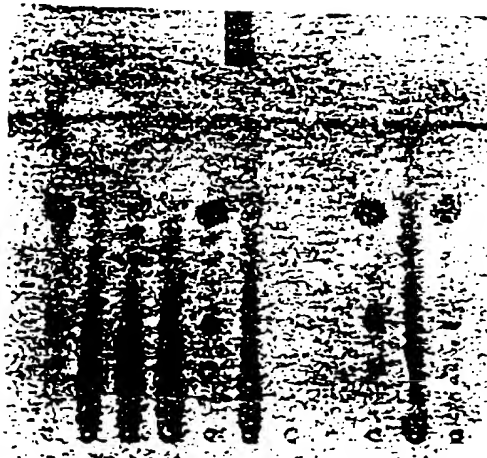
FIG.6

1



FIG.7

2



DLC chromatogram volgens de montol bepaling van geïsoleerde pectinefracties uit Nederlandse hop A (standaard mannurozuur). De pectine zijn opgelost in bier, tenzij anders vermeld.

Plaat 1 (van links naar rechts): standaard, pectine commercieel (pc) 1 g/hl, pc 5 g/hl, pc 10 g/hl, standaard, stengelpectine (sp) 1 g/hl, sp 5 g/hl, sp 10 g/hl, standaard, bier, standaard.

Plaat 2 (van links naar rechts): standaard, bel pectine (bp) 1 g/hl, bp 5 g/hl, bp 10 g/hl, standaard, bier, bel pectine in water 5 g/hl, stengel pectine in water 5 g/hl, standaard, bier, standaard.

Verbetering van de schuimstabiliteit van pilsner referentiebiert, na toevoeging van hoppectine uit residuen van hexaan-, ethanol- en CO₂-extracten, montol (100%), stengel pectine, hopbel pectine en commercieel pectine (100%)

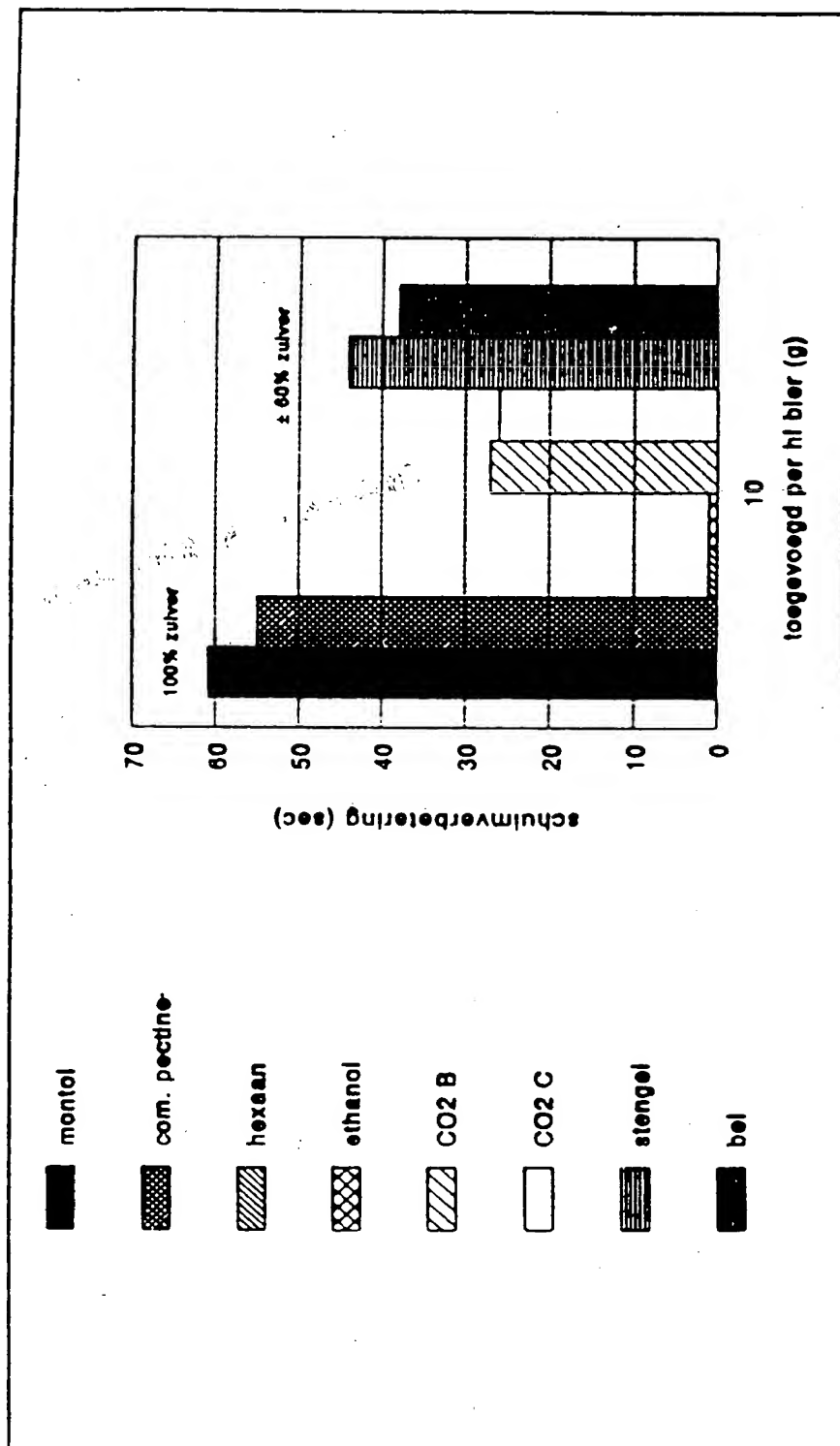


FIG.8

THIS PAGE BLANK (USPTO)